

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 6 月 14 日 (14.06.2001)

PCT

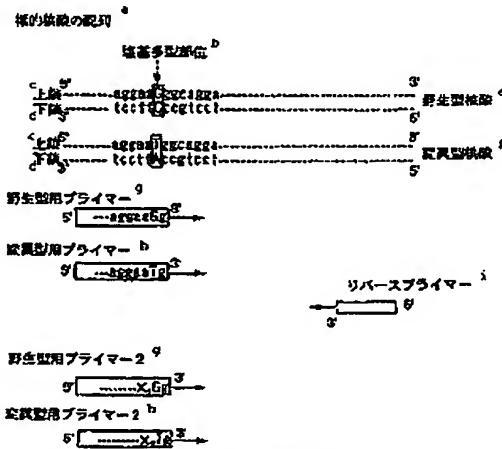
(10) 国際公開番号
WO 01/42498 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/09 特願2000/208794 2000 年 7 月 10 日 (10.07.2000) JP
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08657 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-0004 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号 Osaka (JP).
(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 11/351837
1999 年 12 月 10 日 (10.12.1999) JP
(72) 発明者: および
(73) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 青野利哉 (AONO, Toshiya) [JP/JP]; 宝田 裕 (TAKARADA, Yutaka) [JP/JP]; 瀬川昌也 (SEGAWA, Masaya) [JP/JP]; 吉貫勝子 (YOSHIGA, Satoko) [JP/JP]; 〒520-0243 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社 総合研究所内 Shiga (JP).

[続き有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

(54) 発明の名称: 塩基多型の検出方法



X₁, X₂ = T, G, C (X₁, X₂は同一または相異なってもよい。)

- a...SEQUENCE OF TARGET NUCLEIC ACID
- D...NUCLEOTIDE POLYMORPHISM SITE
- c...UPPER CHAIN
- d...LOWER CHAIN
- e...WILD TYPE NUCLEIC ACID
- f...VARIANT NUCLEIC ACID
- g...PRIMER FOR WILD TYPE
- h...PRIMER FOR VARIANT
- i...REVERSE PRIMER
- j...X₁, X₂ = T, G, C IN, AND X₂ MAY BE EITHER THE SAME OR DIFFERENT

(57) Abstract: A method of detecting variation or polymorphism in a nucleic acid sequence, which is useful particularly in diagnosing a hereditary disease, analyzing nucleotide polymorphism, etc., and primers to be used therein. More particularly speaking, this method comprises creating a primer for wild type and one or two primers for variant with DNA polymerase either simultaneously or separately, and detecting the nucleotide polymorphism contained in the nucleic acid sample by judging whether or not the primers are extended, or whether or not the primers are amplified with a reverse primer. In this method, the 3'-end second bases of the primer for wild type and one or two primers for variant correspond to respective nucleotides anticipated in the nucleotide polymorphism site. Further, at least one of the bases from the 3'-end third position to the 5'-end is substituted by a base not complementary to the base in the chain hybridized with the primer in the chromosome or fragment. Furthermore, the not complementary base as described above differs from primer to primer.

[続き有]

WO 01/42498 A1

47

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁 (J P)

再公表特許 (A 1)

(11)国際公開番号

WO 0 1 / 0 4 2 4 9 8

発行日 平成15年6月3日 (2003.6.3)

(43)国際公開日 平成13年6月14日 (2001.6.14)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

Z N A A

Z N A

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁)

出願番号

特願2001-544370(P2001-544370)

(21)国際出願番号

P C T / J P 0 0 / 0 8 6 5 7

(22)国際出願日

平成12年12月7日 (2000.12.7)

(31)優先権主張番号

特願平11-351837

(32)優先日

平成11年12月10日 (1999.12.10)

(33)優先権主張国

日本 (J P)

(31)優先権主張番号

特願2000-208794(P2000-208794)

(32)優先日

平成12年7月10日 (2000.7.10)

(33)優先権主張国

日本 (J P)

(81)指定国

EP (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E, T R), J P, U S

(71)出願人 東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 青野 利哉

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社 総合研究所内

(72)発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社 総合研究所内

(72)発明者 瀬川 昌也

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社 総合研究所内

(74)代理人 弁理士 三枝 英二 (外8名)

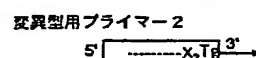
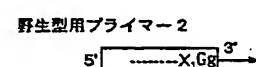
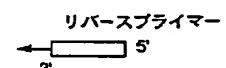
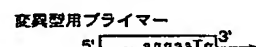
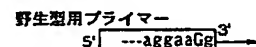
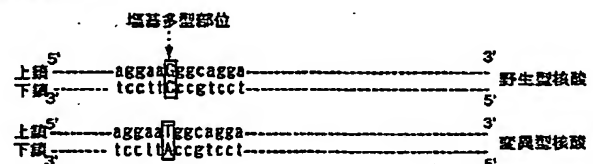
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 塩基多型の検出方法

(57)【要約】

本発明は、遺伝病の診断、塩基多型解析等に際して特に有用な、核酸配列の変異または多型の検出方法及びそれに用いられるプライマーを提供することを目的とする。具体的には、本発明は、試料中に含まれる特定の塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させ、該プライマーが伸長されたか否かによって、又はリバースプライマーと共に増幅したか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する方法であって、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、又は更に3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、または更に該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする検出方法を提供する。

標的核酸の配列



X₁, X₂ = T, G, C (X₁, X₂は同一または相異なってもよい。)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び 1 種又は 2 種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNA ポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 該プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの 3' 末端より 2 番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応する、検出方法。

【請求項 2】 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び 1 種又は 2 種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNA ポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 該プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの 3' 末端より 2 番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの 3' 末端の 3 番目から 5' 末端までの少なくとも 1 つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 3】 該各プライマーの 3' 末端の 3 番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている請求項 2 に記載の検出方法。

【請求項 4】 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び 1 種又は 2 種の変異型用プライマーを同時に又は

別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 該プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項5】 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、請求項4に記載の検出方法。

【請求項6】 DNAポリメラーゼが、二本鎖DNAの3'エキソヌクレアーゼ活性を有する請求項1に記載の方法。

【請求項7】 DNAポリメラーゼが、ピロコッカス・スピーシーズ (*Pyrococcus* sp.) KOD1株もしくはハイパーサーモフィリック・アーカエバクテリウム (*Hyperthermophilic archaeobacterium*) 由来である請求項1に記載の方法。

【請求項8】 (a) の工程の前に、試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片を増幅させる工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 染色体又はその断片を増幅させる方法が、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAからなる群から選ばれたいずれかの方法である請求項8に記載の方法。

【請求項10】 該各プライマーが伸長されたか否かを、野生型用プライマー及び変異型用プライマーからなる群のすくなくとも1種から伸長した産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 該各プライマーの少なくとも1つまたは検出用プローブが、予

め標識されている請求項10に記載の方法。

【請求項12】 該各プライマーの少なくとも1つまたは検出用プローブが、酵素、ビオチン、蛍光物質、ハプテン、抗原、抗体、放射性物質および発光団からなる群から選ばれる少なくとも1種によって標識されている請求項10に記載の方法。

【請求項13】 (a) 工程を単一の容器で行い、該各プライマーが伸長されたか否かを、野生型用プライマー及び変異型用プライマーからなる群のすくなくとも1種から伸長した産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応する、検出方法。

【請求項15】 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基

と相補的でない塩基に置換されている、請求項14に記載の検出方法。

【請求項16】 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている請求項15に記載の検出方法。

【請求項17】 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、請求項14に記載の検出方法。

【請求項18】 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、請求項17に記載の検出方法。

【請求項19】 DNAポリメラーゼが二本鎖DNAの3'エキソヌクレアーゼ活性を有する請求項14に記載の方法。

【請求項20】 DNAポリメラーゼが、ピロコッカス・スピーシーズ (*Pyrococcus* sp.) KOD1株もしくはハイパーサーモフィリック・アーカエバクテリウム (*Hyperthermophilic archaeobacterium*) 由来である請求項14に記載の方法。

【請求項21】 染色体又はその断片を増幅させる方法が、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAからなる群から選ばれたいずれかの方法

である請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かを、野生型用プライマー及び／又は変異型用プライマーを用いた各増幅産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 23】 該各プライマーの少なくとも 1 つ又は検出用プローブが、予め標識されている請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】 該各プライマーの少なくとも 1 つ又は検出用プローブが、酵素、ビオチン、蛍光物質、ハプテン、抗原、抗体、放射性物質および発光団からなる群から選ばれる少なくとも 1 種によって標識されている請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】 (a) 工程を単一の容器で行い、特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かを、野生型用プライマー及び／又は変異型用プライマーを用いた各増幅産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 26】 野生型用プライマー及び 1 種又は 2 種の変異型用プライマー、DNA ポリメラーゼ及び 4 種類のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP) を含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの 3' 末端より 2 番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応するキット。

【請求項 27】 野生型用プライマー及び 1 種又は 2 種の変異型用プライマー、DNA ポリメラーゼ及び 4 種類のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP) を含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの 3' 末端より 2 番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの 3' 末端の 3 番目から 5' 末端までの少なくとも 1 つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】 該各プライマーの 3' 末端の 3 番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ及び4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）を含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 30】 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されて、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、請求項 29 に記載のキット。

【請求項 31】 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）及び検出用プローブを含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応するキット。

【請求項 32】 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）及び検出用プローブを含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、請求項 31 に記載のキット。

【請求項 33】 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 34】 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）及び

検出用プローブを含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、請求項31に記載のキット。

【請求項35】 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されて、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、請求項34に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、核酸配列の変異または多型の検出方法並びにそれに用いられるプライマー及び検出用キットに関する。本発明は、遺伝病の診断、塩基多型解析等の際して特に有用である。

背景技術

遺伝子の塩基多型は、個体間において、薬物代謝における副作用および薬物の治療失敗の原因の一つとして考えられている。また、塩基多型は、体質として知られる基礎代謝等の個人差の原因としても知られている。さらに、塩基多型は多数の疾患の遺伝マーカーとしての働きもする。それゆえ、これら塩基多型の解析は、臨床的に重要であり、ルーチンの表現型分類は精神医学患者および自殺志願者を対象とした臨床研究に特に推奨される（GramおよびBrsen, European Consensus Conference on Pharmacogenetics. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1990, 第87～96頁; Balantら, Eur. J. Clin. Pharmacol. 第36巻、第551～554頁、(1989)）。上記のような理由から、原因となる変異型遺伝子の同定と、それに続くそれぞれの遺伝子型の検出用の核酸配列分析法が所望される。

従来の核酸配列分析技術としては、例えば核酸配列決定法（sequencing）がある。核酸配列決定法は核酸配列中に含まれる塩基多型を検出、同定することができるが、鋳型核酸の調製、DNAポリメラーゼ反応、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、核酸配列の解析等を行うため、多大な労力と時間が必要である。また核酸配列決定法は、近年の自動シーケンサーを用いることで省力化は行うことができるが、高価な装置が必要であるという問題がある。

一方、遺伝子の点突然変異により引き起こされる遺伝病が種々知られており、それらの中には、遺伝子のどの部位がどのように点突然変異することにより遺伝病が引き起こされるかわかっているものも少なくない。

このような予想される点突然変異を検出する方法として、従来より、PCR（

polymerase chain reaction) 法 (特公平4-67960号公報、特公平4-67957号公報) などの遺伝子増幅法を利用した遺伝子の点突然変異の検出方法が知られている。この方法では、遺伝子増幅法に用いる一対のプライマーのうち一方のプライマーとして、野生型遺伝子の増幅領域の端部領域に完全に相補的な野生型用プライマーと、変異型遺伝子の増幅領域の端部領域に完全に相補的な変異型用プライマーとを用いる。変異型用プライマーは、その3'末端が予想される点突然変異を起こしたヌクレオチドに相補的なヌクレオチドになっている。このような野生型及び変異型用プライマーをそれぞれ別個に用いて試料遺伝子を遺伝子増幅法に供する。

試料遺伝子が野生型であれば、野生型用プライマーを用いた場合には核酸の増幅が起きるが、変異型用プライマーを用いた場合には、プライマーの3'末端が試料遺伝子の対応ヌクレオチドと相補的ではない (ミスマッチ) ので、伸長反応が起きず、核酸の増幅は起きない。一方、試料遺伝子が変異型であれば、逆に、野生型用プライマーを用いた場合には増幅が起きず、変異型用プライマーを用いた場合に増幅が起きる。従って、各プライマーを用いた場合に増幅が起きるか否かを調べることにより、試料遺伝子が野生型か変異型かを判別することができ、それによって試料遺伝子中の点突然変異を検出することができる。

また点突然変異を含む核酸配列を予め増幅しておき、各プライマーにおいて増幅核酸を用いて伸長反応が起きるか否かでの判定を行ってもかまわない。この方法を塩基多型の分析に応用することも可能である。

上記のような原理によれば、従来法により明確に塩基多型の検出が行えるように思われるが、実際には、点突然変異の場合には野生型用プライマーと変異型用プライマーとはわずか1塩基の相違があるのみであり、変異型用プライマーを用いて野生型遺伝子を伸長もしくは増幅した場合、及び野生型用プライマーを用いて変異型遺伝子を伸長もしくは増幅した場合にも、ある程度の反応 (即ち、伸長もしくは増幅) が起きることが多く、明確な判定が困難となる場合が少なくない。また、上述のようなミスマッチのプライマーを用いた場合に伸長または増幅が起きるか否かは、用いる機器の種類やその他の微妙な条件によって左右され、再現性も低い。従って、ミスマッチのプライマーを用いた場合に反応が完全に起こ

らないようにするためには、反応時の温度条件等を極めて厳密に制御する必要があり、かなり困難な作業になる。しかも、Taqポリメラーゼのように3'エキソヌクレアーゼ活性が欠損したDNAポリメラーゼを用いて伸長反応を実施した場合、伸長反応時に取り込みエラーがあってもそれを校正することができず、新たなエラーを含んだ伸長反応を行う場合がある。

一方、正確な伸長反応が可能である3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いた場合の条件設定は、更に困難である。特に、プライマーの3'末端の配列がミスマッチの場合、本来伸長反応が起こらないことを期待しているにもかかわらず、校正機能によりミスマッチの塩基が削除され、伸長反応が起こってしまう可能性がある。

本発明の目的は、上記のような課題を解決して、明確にかつ再現性よく核酸配列中の塩基多型を検出することができる方法及びそのための試薬を提供することである。

発明の開示

本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意研究の結果、上記の従来法において、野生型用プライマーが変異型遺伝子とハイブリダイズする際及び変異型用プライマーが野生型遺伝子とハイブリダイズする際に、プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドを塩基多型部位に対応させることにより、厳密な反応条件の制御を行わなくとも、ミスマッチのプライマーの伸長または増幅反応を完全に阻害することができ、したがって容易に明確な判定が可能となることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

項1. 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 該プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想され

る各ヌクレオチドに対応する、検出方法。

項2. 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 該プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、項1に記載の検出方法。

項3. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中のプライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている項2に記載の検出方法。

項4. 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 該プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、項1に記載の検出方法。

項5. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且

つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、項4に記載の検出方法。

項6. DNAポリメラーゼが、二本鎖DNAの3' エキソヌクレアーゼ活性を有する項1に記載の方法。

項7. DNAポリメラーゼが、ピロコッカス・スピーシーズ (*Pyrococcus* sp.) KOD1株もしくはハイパーサーモフィリック・アーカエバクテリウム (*Hyperthermophilic archaeobacterium*) 由来である項1に記載の方法。

項8. (a) の工程の前に、試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片を増幅させる工程を含む、項1に記載の方法。

項9. 染色体又はその断片を増幅させる方法が、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAからなる群から選ばれたいずれかの方法である項8に記載の方法。

項10. 該各プライマーが伸長されたか否かを、野生型用プライマー及び変異型用プライマーからなる群のすくなくとも1種から伸長した産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、項1に記載の方法。

項11. 該各プライマーの少なくとも1つまたは検出用プローブが、予め標識されている項10に記載の方法。

項12. 該各プライマーの少なくとも1つまたは検出用プローブが、酵素、ビオチン、蛍光物質、ハプテン、抗原、抗体、放射性物質および発光団からなる群から選ばれる少なくとも1種によって標識されている項10に記載の方法。

項13. (a) 工程を単一の容器で行い、該各プライマーが伸長されたか否かを、野生型用プライマー及び変異型用プライマーからなる群のすくなくとも1種から伸長した産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、項1に記載の方法。

項14. 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断

片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応する、検出方法。

項15. 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、項14に記載の検出方法。

項16. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている項15に記載の検出方法。

項17. 核酸試料中に含まれる一塩基多型を検出する方法であって、該方法が、

(a) 試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時に又は別々に、DNAポリメラーゼと共に作用させる工程、

(b) 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する工程を含み、

該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が塩基多型部位の予想され

る各ヌクレオチドに対応し、

該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、項14に記載の検出方法。

項18. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とする、項17に記載の検出方法。

項19. DNAポリメラーゼが二本鎖DNAの3'エキソヌクレアーゼ活性を有する項14に記載の方法。

項20. DNAポリメラーゼが・ピロコッカス・スピーシーズ (*Pyrococcus* sp.) KOD1株もしくはハイパーサーモフィリック・アーカエバクテリウム (*Hyperthermophilic archaeobacterium*) 由来である項14に記載の方法。

項21. 染色体又はその断片を増幅させる方法が、PCR、NASBA、LCR、SDA、RCRおよびTMAからなる群から選ばれたいずれかの方法である項14に記載の方法。

項22. 特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かを、野生型用プライマー及び／又は変異型用プライマーを用いた各増幅産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、項14に記載の方法。

項23. 該各プライマーの少なくとも1つ又は検出用プローブが、予め標識されている項22に記載の方法。

項24. 該各プライマーの少なくとも1つ又は検出用プローブが、酵素、ビオチン、蛍光物質、ハプテン、抗原、抗体、放射性物質および発光団からなる群から選ばれる少なくとも1種によって標識されている項22に記載の方法。

項25. (a) 工程を単一の容器で行い、特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かを、野生型用プライマー及び／又は変異型用プ

ライマーを用いた各増幅産物の配列に特異的な検出用プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うことによって検出する、項14に記載の方法。

項26. 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ及び4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)を含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応するキット。

項27. 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ及び4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)を含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、項26に記載のキット。

項28. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、項27に記載のキット。

項29. 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ及び4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)を含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、項26に記載のキット。

項30. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、項29に記載のキット。

項31. 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、D

NAポリメラーゼ、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）及び検出用プローブを含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応するキット。

項32. 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）及び検出用プローブを含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、項31に記載のキット。

項33. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、項32に記載のキット。

項34. 野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）及び検出用プローブを含む一塩基多型検出用試薬キットであって、該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、項31に記載のキット。

項35. 該各プライマーの3'末端の3番目の塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる塩基とした、項34に記載のキット。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、「塩基多型」とは、染色体またはその断片中のある部位において、個体間で2種以上の塩基が存在することをいい、一方を野生型、それとは

異なる塩基を有するものを変異型という。また「塩基多型部位」とは、野生型と変異型が存在している塩基多型の位置をいう。

本発明において、染色体又はその断片を単に核酸ということがある。「野生型核酸」とは、塩基多型部位を含む核酸であって、該部位が野生型の塩基を有するものを意味する。「変異型核酸」とは、塩基多型部位を含む核酸であって、野生型核酸のうち少なくとも1つ、好ましくは1つのヌクレオチドが点突然変異して他のヌクレオチドに置換されているものや、野生型核酸の一部に挿入、欠失配列等を含む核酸のことであり、どの部位のヌクレオチドが変異しているかが解明されているものである。より好ましくは、「変異型核酸」とは、塩基多型部位を含む核酸であって、該部位が野生型の塩基とは異なる塩基で置換されているものをいう。このような塩基多型により体質等が異なっていることが解明されてきており、本発明の方法は試料中の核酸がこのような予想される変異を有しているか否かを検査する方法である。

「野生型用プライマー」とは、野生型の塩基多型部位にハイブリダイズすることができるプライマーを意味する。また、「変異型用プライマー」とは、変異型の塩基多型部位にハイブリダイズすることができるプライマーを意味する。

「野生型用プローブ」とは、野生型用プライマーによって伸長または増幅した産物を特異的に検出するプローブである。また、「変異型用プローブ」とは、変異型用プライマーによって伸長または増幅した産物を特異的に検出するプローブである。

試料中に含まれる特定の一塩基多型部位を含む染色体又はその断片は、目的の遺伝子の情報を担う塩基多型部位を含む標的核酸であれば、特に制限されず、ミトコンドリア等も含まれる。該標的核酸の例としては、A I u 配列、蛋白質をコードする遺伝子のエキソンやイントロン、プロモーターなどが例示できる。より具体的には、遺伝病を含む各種疾患、薬物代謝、生活習慣病（高血圧、糖尿病等）に関連する遺伝子が挙げられる。例えば、高血圧としてACE（Angiotensin I Converting Enzyme）遺伝子、糖尿病としてPPAR γ （peroxisome proliferator-activated receptor γ ）が挙げられる。

核酸を複製する場合、一本鎖に変性した標的核酸にプライマー、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）とDNAポリメラーゼを作用させることで、標的核酸を鋳型としてプライマー伸長反応が起こり核酸配列の相補鎖が合成されて複製できる。

本発明において、プライマーが伸長されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する方法とは、核酸試料中の特定の塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、野生型用プライマーと、1種又は2種の変異型用プライマーを同時又はそれぞれ別々に用いて伸長反応を行うことにより多型を検出する方法である。

また、特定の塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによって、その核酸試料中に含まれる塩基多型を検出する方法とは、特定の塩基多型部位を含む染色体又は断片を含む核酸試料に、フォワードプライマーに相当する野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーを同時にまたはそれぞれ別々に用いて、リバースプライマーと共に増幅反応を行うことにより多型を検出する方法である。

本発明に用いられる各プライマーは、各プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドが塩基多型配列のヌクレオチドと対応するように設計されている。

即ち、図1において、ある塩基多型部位において野生型の塩基が“G”、変異型の塩基が“T”であり、塩基多型部位の3'側の塩基がGの場合には、野生型核酸を伸長または増幅するための野生型用プライマーは5'-----Gg 3'、変異型用プライマーは5'-----Tg 3'となる。このように設計した場合、野生型用プライマー／野生型核酸及び変異型用プライマー／変異型核酸の組合せにおいて、各プライマーは核酸と完全に一致する為伸長または増幅は起こる。一方、野生型用プライマー／変異型核酸及び変異型用プライマー／野生型核酸の組合せにおいてはプライマーの3'末端より2番目の塩基が相補的でない（ミスマッチしている）ため、伸長または増幅が起こらない。特に、本発明者らは、3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いた場合、3'末端にミスマッチがあれば、認識／除去するが、3'末端は相補的な為エキソヌクレアーゼ活性は働かず、またDNAポリメラーゼ反応も起こらない

ことを見出した。

このように、本発明の方法では、野生型用プライマー／変異型核酸及び変異型用プライマー／野生型核酸の組合せでは核酸鎖の伸長または増幅が完全に阻害され、一方、野生型用プライマー／野生型核酸及び変異型用プライマー／変異型核酸の組合せでは、核酸鎖の伸長または増幅が起きる。したがって、本発明の方法によれば、従来法のように偽陽性を生じることなく、標的核酸中の多型を明確に検出することができる。

本発明は、上述したようなプライマーに加えて、ミスマッチの部分をもう1カ所導入した野生型用プライマー及び変異型用プライマーを提供する（図1中の野生型用プライマー2及び変異型用プライマー2を参照）。即ち、本発明に用いられる上記野生型用及び変異型用プライマーは、各プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドが、塩基多型部位のヌクレオチドと対応するように設計され、さらに、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖（図1中“下鎖”）の塩基と相補的でない塩基になるように設計してもよい（以下この部位を「人為的ミスマッチ部位」という。）。図1中の野生型用プライマー2及び変異型用プライマー2においては、各プライマーの3'末端から3番目の塩基が人為的ミスマッチ部位である場合を示しており、該位置のプライマーがハイブリダイズする鎖（図1中“下鎖”）の塩基が“T”である場合に、野生型核酸を伸長または増幅するための野生型用プライマーは5'-----X₁Gg 3'、変異型用プライマーは5'-----X₂Tg 3'（X₁, X₂はTの相補塩基であるA以外の塩基、即ち、T、G、Cのいずれかであって、同一または相異なっているてもよい。）となる。

このように設計した場合、野生型用プライマー／野生型核酸及び変異型用プライマー／変異型核酸の組合せにおいて、各プライマーは少なくとも3'末端から2番目の配列までは一致する為伸長または増幅反応は起こる。一方、野生型用プライマー／変異型核酸及び変異型用プライマー／野生型核酸の組合せにおいては、プライマーの3'末端より2番目の塩基、さらにもう1塩基の人為的ミスマッチがあるため伸長または増幅反応が起こらない。3'エキソヌクレアーゼ活性を

有するDNAポリメラーゼはミスマッチを認識除去する活性を有するが、3'末端は相補的なエキソヌクレアーゼも働かず、誤った伸長反応を起こすことがない。このことにより、野生型用プライマーが変異型核酸と結合すること、及び変異型用プライマーが野生型核酸と結合することが、より効果的に妨げられることを見出した。

更に、本発明のプライマーは、3'末端から2番目の塩基は塩基多型部位の予想されるヌクレオチドに対応する塩基配列であり、更に、3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でなく、且つ該相補的でない塩基は、各々のプライマーにおいて異なる塩基とする様設計された野生型用プライマー及び変異型用プライマーであってもよい。即ち、図1の野生型用プライマー2及び変異型用プライマー2において X_1 、 X_2 が相異なる塩基を有する場合を意味する。

例えば、その3'末端から2番目の塩基が塩基多型部位の予想されるヌクレオチドになるようにプライマーを設計し、野生型用プライマーは野生型核酸の該塩基に対応する塩基、及び変異型用プライマーは変異型核酸の該塩基に対応する塩基を配置させる。さらに、各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの塩基の中のある位置において、プライマーがハイブリダイズする鎖の核酸配列中の塩基がTである場合、例えば、野生型用プライマーは、A以外のT、変異型用プライマーは、A及びT以外のCまたはGと設計する。この人為的ミスマッチの組み合わせは以下の通りである。

表1

人為的ミスマッチを設計する部位の塩基 (プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基(図1中下鎖))	A			G			C			T		
野生型用プライマー中の塩基	G	C	A	A	T	G	A	T	C	G	C	T
変異型用プライマー中の塩基	C	G	C	G	A	A	T	A	A	C	G	G
	A	A	G	T	G	T	C	C	T	T	T	C

このようなプライマーを使用すれば、野生型用プライマーが変異型核酸と結合すること、及び変異型用プライマーが野生型核酸と結合することがより妨げられるとともに、下記の検出のためのプローブにおいても、野生型検出用プローブと

変異型検出用プローブ間において、塩基多型部位と人為的ミスマッチの部位で更にもう一塩基異なる結果、2塩基異なることとなり、より正確な検出が可能となった。

本発明におけるプライマーの長さとしては、13～35塩基、好ましくは、16～30塩基であり、上記人為的ミスマッチ部位は、該プライマー中に少なくとも1つ存在する。また、その位置は、3'末端の3番目から5'末端までのいずれかであれば、特に限定されないが、好ましくは、3'末端の3番目に近い位置、より好ましくは、3'末端から3番目が好ましい。野生型用プライマー及び変異型用プライマーがハイブリダイズする鎖は、上鎖または下鎖どちらでもよい。

3'末端から3番目に人為的ミスマッチを用いた場合、伸長反応を期待しない核酸配列を鋳型とした時には、塩基多型部位と併せて2塩基連続のミスマッチとなり、伸長反応が強く阻害される。一方、他の部分に用いた場合は、プライマーの非連続的な2カ所のミスマッチにより鋳型へのハイブリダイゼーションそのものが妨げられ、結果として伸長反応を抑制できる。

本発明における、プライマーの伸長方法は、基本的には、従来の方法を用いて行うことができる。通常、一本鎖に変性させた特定の塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)及びDNAポリメラーゼと共に、野生型用プライマーと、1種又は2種の変異型用プライマーを同時又はそれぞれ別個に用いて作用させることで、標的核酸を鋳型としてプライマーが伸長する。

該伸長反応は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrookら、1989)に記載の方法に従って行うことができる。また、該プライマーが伸長されたか否かによって塩基多型を検出する方法において、標的核酸が検出するのに十分な量が含まれていない場合、前記多型配列を含む核酸断片を以下に示す増幅反応によって、予め増幅しておくことも可能である。

本発明における、特定の塩基多型部位を含む染色体又は断片の増幅方法も、基本的には、従来の方法を用いて行うことができ、通常、一本鎖に変性させた特定の塩基多型部位を含む染色体又はその断片に、4種類のデオキシヌクレオシド三

リン酸 (dNTP) 及びDNAポリメラーゼ及びリバースプライマーと共に、野生型用プライマーと、1種又は2種の変異型用プライマーを同時又はそれぞれ別個に用いて作用させることで、標的核酸を鋳型としてフォワードプライマー (野生型用プライマーまたは変異型用プライマー) とリバースプライマーの間で増幅される。

核酸増幅方法としては、PCR、NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification method; Nature 第350巻、第91頁 (1991))、LCR (国際公開89/12696号公報、特開平2-2934号公報)、SDA (Strand Displacement Amplification: Nucleic acid research 第20巻、第1691頁 (1992))、RCR (国際公開90/1069号公報)、TMA (Transcription mediated amplification method; J. Clin. Microbiol. 第31巻、第3270頁 (1993)) などが挙げられる。

なかでもPCR法は、標的核酸、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、一対のプライマー及び耐熱性DNAポリメラーゼの存在下で、変性、アニーリング、伸長の3工程からなるサイクルを繰り返すことにより、上記一対のプライマーで挟まれる標的核酸の領域を指数関数的に増幅させる方法である。すなわち、変性工程で試料の核酸を変性し、続くアニーリング工程において各プライマーと、それぞれに相補的な一本鎖標的核酸上の領域とをハイブリダイズさせ、続く伸長工程で、各プライマーを起点としてDNAポリメラーゼの働きにより鋳型となる各一本鎖標的核酸に相補的なDNA鎖を伸長させ、二本鎖DNAとする。この1サイクルにより、1本の二本鎖DNAが2本の二本鎖DNAに増幅される。従って、このサイクルをn回繰り返せば、理論上上記一対のプライマーで挟まれた試料DNAの領域は 2^n 倍に増幅される。増幅されたDNA領域は大量に存在するので、電気泳動等の方法により容易に検出できる。よって、遺伝子増幅法を用いれば、従来では検出不可能であった、極めて微量 (1分子でも可) の標的核酸をも検出することが可能であり、最近非常に広く用いられている技術である。

本発明の特定の一塩基多型部位を含む染色体又は断片が増幅されたか否かによ

って塩基多型を検出する方法では、野生型核酸を増幅できる野生型用プライマーと、変異型核酸を増幅できる変異型用プライマーをそれぞれ別個又は同時に用いて遺伝子増幅法を行う。

野生型用プライマーを用いて標的核酸を伸長または増幅反応を行った場合、標的核酸が野生型であれば伸長または増幅されるが、変異型では伸長または増幅されない。逆に、変異型用プライマーを用いて標的核酸を伸長または増幅反応を行った場合、標的核酸が変異型であれば伸長または増幅されるが、野生型であれば伸長または増幅されない。従って、一つの試料を二つに分け、一方は野生型用プライマーを用い、他方は変異型用プライマーを用い、伸長または増幅反応が起きたか否かを調べることにより、標的核酸が野生型であるか変異型であるかを明確に知ることができる。特に、ヒトを始め、高等生物は、1種類の遺伝子について、父親由来の遺伝子と母親由来の遺伝子をそれぞれ1つずつ有しているが、この方法によれば、試料遺伝子が野生型のホモか、変異型のホモか、あるいは、両方のヘテロかを区別することもできる。すなわち、ヘテロの場合には、野生型核酸（野生型遺伝子）と変異型核酸（変異型遺伝子）が共に存在するから野生型用プライマーを用いた場合も変異型用プライマーを用いた場合も伸長または増幅反応が起きる。

また、本発明の伸長工程及び増幅工程において、単一の容器中で野生型用プライマー及び変異型用プライマーを、DNAポリメラーゼと共に作用させてもよい。即ち、1つの試料中に含まれる核酸に野生型用プライマー及び変異型用プライマーを同時にDNAポリメラーゼと共に作用させ、伸長または増幅反応を行い、以下に示すように野生型用プローブ及び変異型用プローブを伸長または増幅された産物にハイブリダイズさせることによって、標的核酸が野生型か変異型かを調べることができる。

本発明のプライマーを使用することにより、伸長又は増幅反応時の温度、濃度等の条件を極めて厳密に制御する必要がなくなり、より緩和な条件で反応を行っても、より正確な検出を行うことが可能となる。

例えば、伸長又は増幅反応において、プライマーを標的核酸にアニールさせる温度は、これまでの方法では、 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ の精度で制御する必要がある場合も少

なくなかったが、本発明のプライマーを使用した場合 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以上の誤差があっても検出結果の正確性には影響を受けない。

DNAポリメラーゼ

本発明の伸長反応又は増幅反応に使用されるDNAポリメラーゼとしては、通常該反応に使用されるDNAポリメラーゼが使用できる。

好ましくは、二本鎖DNAの3' エキソヌクレアーゼ活性を有するものがよい。増幅反応によく用いられるサーマス・アクエティカス (*Thermus aquaticus*) 由来のDNAポリメラーゼ等は、3' エキソヌクレアーゼ活性を持たないため、増幅反応を行った場合、正確に鋳型配列の相補鎖を合成できなかった時もそのまま増幅反応を続けるため、増幅核酸断片に予想外の変異を含有する可能性が否定できないためである。

より好ましくは、伸長反応の正確性が優れているピロコッカス・スピーシーズ (*Pyrococcus* sp.) KOD1株もしくはハイパーサーモフィリック・アーカエバクテリウム (*Hyperthermophilic archaeobacterium*) 由来のDNAポリメラーゼがよい。

伸長または増幅条件

伸長または増幅の条件としては、使用するDNAポリメラーゼやプライマーの配列によっても異なるが、通常されている条件であれば特に限定されない。本発明によれば、上述のごとく、各プライマーを標的核酸にアニールさせる温度は、 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ の精度で制御する必要はなく、 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以上の誤差があっても行うことができる。

検出

上記伸長反応又は増幅反応によって得られた産物から、塩基多型を検出する方法としては、特に制限はなく通常採用されている方法、例えば塩基配列の配列決定、ハイブリダイゼーションや制限酵素の利用によるもの等により好ましく行い得る。

例えば、ハイブリダイゼーションを利用する場合、該各プライマーを、予め酵素、ビオチン、蛍光物質、ハプテン、抗原、抗体、放射性物質および発光団などによって標識しておき、伸長又は増幅反応後に該標識を検出することによって、

行うことができる。または、リバープライマーを標識しておいてもよい。または、下記に示される検出用プローブを標識しておいてもよい。または、それらは1種または2種以上の標識剤で標識されていてもよい。

酵素としては、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼなどが挙げられる。

蛍光物質としては、FITC、6-FAM、HEX、TET、TAMRA、テキサスレッド、Cy3、Cy5などが挙げられる。

ハプテンとしては、ビオチンなどが挙げられる。

放射性物質としては、 ^{32}P 、 ^{35}S などが挙げられる。

発光団としては、ルテニウムなどが挙げられる。

抗原としてはジゴキシゲニン、抗体としては抗ジゴキシゲニンが挙げられる。

該標識は、プライマーの伸長反応に影響を与えることがなければプライマーのどの位置に結合させてもよい。好ましくは、5' 部位である。

具体的には、野生型用プライマー及び変異型用プライマーによって伸長、増幅された産物を特異的に捕捉することができる野生型検出用プローブ及び変異型検出用プローブを、公知の方法に従い、マイクロタイタープレートなどの固相に結合させる。次に、伸長又は増幅した産物を変性させ、該検出用プローブが結合したマイクロタイタープレートに添加する。野生型用プライマーによって伸長、増幅された産物は野生型検出用プローブにのみ結合し、変異型検出用プローブには結合しない。また、変異型用プライマーによって、伸長、増幅された産物は変異型検出用プローブにのみ結合し、野生型検出用プローブには結合しない。その後、プライマーに結合している標識を検出することによって、試料に含まれている染色体又はDNA断片の塩基多型を検出することができる。

野生型検出用プローブまたは変異型検出用プローブは、同じものであっても、野生型用プライマーまたは変異型用プライマーの伸長または増幅産物にそれぞれ特異的であってもよい。

本発明の方法では、塩基多型部位に加えて、人為的ミスマッチの部位においても野生型用プライマーと変異型用プライマーで異なっている場合には、野生型検

出用プローブまたは変異型検出用プローブは、塩基多型部位及び人為的ミスマッ

チ部位に特異的にハイブリダイズすることができるように設計することが好ましい。このことにより、野生型検出用プローブ及び変異型検出用プローブ間において2塩基の相違が見られることとなるため、塩基多型部位のみ相違している場合と比較して、より明確にそれぞれの伸長／増幅産物を検出することが可能である。したがって、試料を野生型用、変異型用の2つに分けることなく両プライマーで同時に伸長／増幅反応を行い、特異的に野生型検出用プローブと変異型検出用プローブで測り分けることも容易である。具体的には、1つの試料中に含まれる核酸に野生型用プライマー及び変異型用プライマーを同時にDNAポリメラーゼと共に作用させ、伸長または増幅反応を行う。その後、得られた産物を変性させ、2つに分け、野生型用プローブ及び変異型用プローブにハイブリダイズさせることによって、標的核酸が野生型か変異型を調べることができる。野生型用プライマーと変異型用プライマーに異なる標識を用いた場合には、1つのプレートのウェルで行うことができる。

検出用プローブの長さとしては、特に制限されないが、10～100塩基程度、好ましくは、15～50塩基程度、より好ましくは、18～35塩基程度である。

検出方法の条件も特に限定されず、例えば、日本臨床検査自動化学会会誌、第20巻、第728頁（1995年）に記載の方法に従って行うことができる。

キット

本発明において、キットとしては、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマー、DNAポリメラーゼ及び4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）を含む塩基多型検出用試薬キットを含むものであり、野生型用プライマー及び1種又は2種の変異型用プライマーにおいて、

- ・該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応する、
- ・該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換されている、または

・該各プライマーの3'末端より2番目の塩基が、塩基多型部位の予想される各ヌクレオチドに対応し、該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なるという特徴を有する。

増幅によって検出する場合には、更に、リバースプライマーを含んでいてもよい。

また、検出の際に、プローブを使用する場合には、本発明のキットは更に、検出用プローブを含んでいてもよい。

本発明で使用する検出用プローブは、野生型と変異型を共に検出できるものであってもよいが、好ましくは、野生型と変異型を各々検出するために各型検出用プローブを用意するのがよい。その場合、各検出用プローブは塩基多型部位を含むことが好ましい。

更に、伸長または増幅に用いる該各プライマーの3'末端の3番目から5'末端までの少なくとも1つの塩基が、染色体又はその断片中の該プライマーがハイブリダイズする鎖の塩基と相補的でない塩基に置換され、且つ該相補的でない塩基は、各プライマーにおいて異なる場合には、野生型検出用プローブまたは変異型検出用プローブは、野生型用プライマーまたは変異型用プライマーの伸長または増幅産物を特異的に検出することができるように設計することが好ましい。このことにより、その検出用プローブ間においては、塩基多型部位と人為的ミスマッチの部位で更にもう一塩基異なることとなるため、より特異的な検出が可能となる。

また、該各プライマーまたは検出用プローブは、予め上述したような酵素、ビオチン、蛍光物質、ハプテン、抗原、抗体、放射性物質および発光団などによって標識されていてもよい。

このように、本発明の方法では、野生型用プライマー／変異型核酸及び変異型用プライマー／野生型核酸の組合せでは核酸鎖の伸長が完全に阻害され、一方、野生型用プライマー／野生型核酸及び変異型用プライマー／変異型核酸の組合せ

では核酸鎖の伸長が起きる。したがって、本発明の方法によれば、従来法のように偽陽性を生じることなく、標的核酸中の塩基多型を明確に検出することができる。

実施例

以下、実施例に基づき本発明をより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1 ACE (Angiotensin Converting Enzyme) 遺伝子の塩基多型検出

(1) ACE 遺伝子 2350 番の多型を検出するプライマーの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号1に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プライマー1と示す）および配列番号2に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プライマー2と示す）および配列番号3に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プライマー3と示す）および配列番号4に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プライマー4と示す）および配列番号5に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、プライマー5と示す）を合成した。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

プライマー1はヒトACE遺伝子の野生型核酸の配列を有し、その3'末端が塩基多型部位であって野生型のヌクレオチド(A)を有し、プライマー2はヒトACE遺伝子の変異型核酸の配列を有し、その3'末端が塩基多型部位であって変異型のヌクレオチド(G)を有し、プライマー3はヒトACE遺伝子の野生型核酸の配列を有し、3'末端から2番目が塩基多型部位であって野生型のヌクレオチド配列(A)を有し、プライマー4はヒトACE遺伝子の変異型核酸の配列を有し、3'末端から2番目が塩基多型部位であって変異型のヌクレオチド(G)を有する。プライマー5はプライマー1～4のいずれとも対になるリバースプライマーである。

(2) PCR法によるACE遺伝子多型の解析

ヒト白血球からフェノール・クロロフォルム法により抽出した3種類のDNA溶液（野生型のホモ（Aホモ）、変異型のホモ（Gホモ）、ヘテロ型）をサンプルとして使用して、下記試薬を添加して、下記条件によりヒトACE遺伝子多型を解析した。

（a）試薬及び増幅条件

以下の試薬を含む25 μ l 溶液を調製した。

プライマー1～4のいずれか	5 pmol
プライマー5	5 pmol
$\times 10$ 緩衝液	2.5 μ l
2mM dNTP	2.5 μ l
25mM MgSO ₄	1 μ l
KOD plus DNAポリメラーゼ	0.2 U
抽出された各DNA溶液	100 ng

増幅条件

94℃・2分

94℃・15秒、55℃・30秒、68℃・30秒（35サイクル）

68℃・2分

（b）検出

得られたPCR産物を常法に従ってアガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色して増幅産物のバンドを検出した。その結果、下記表2に示すような結果が得られた。

表2

プライマーの種類 DNA試料	プライマー 1	プライマー 2	プライマー 3	プライマー 4
野生型のホモ (Aホモ)	+	+	+	-
変異型のホモ (Gホモ)	+	+	-	+
ヘテロ型	+	+	+	+

+ : 増幅した

- : 増幅しなかった

上記のように、KODplus DNAポリメラーゼとプライマーの3'末端から2番目の部位に塩基多型配列を含むプライマー（プライマー3及びプライマー4）によって試料の遺伝子型を明確に判定することができた。

実施例2 ADD (Alpha Adducin) 遺伝子の塩基多型 (Gly 460 Trp) の検出

(1) ADD遺伝子のエキソン10、246番目の多型を検出するプライマーの合成

パーキンエルマー社製DNAシンセサイザー392型を用いて、ホスホアミダイト法にて、配列番号6～13に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、オリゴ6～13と示す）を合成した。合成はマニュアルに従い、各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃、一夜実施した。オリゴヌクレオチドの精製はパーキンエルマー社OPCカラムにて実施した。

オリゴ6（配列番号6）及びオリゴ7（配列番号7）は野生型（G）／変異型（T）で共通のヌクレオチド配列（多型部位を含まない）を有し、オリゴ6がセンス鎖、オリゴ7がアンチセンス鎖であり、いずれも伸長／増幅反応のプライマーとして使用される（ヒトADD遺伝子と相同な配列）。オリゴ8（配列番号8）及びオリゴ9（配列番号9）はオリゴ6とオリゴ7による増幅産物をそれぞれ検出するためのプローブとして使用され、オリゴ8は野生型（G）、オリゴ9は変異型（T）の検出に使用される（オリゴ8：ヒトADD遺伝子の塩基多型（Gly 460 Trp）の野生型配列と相同な配列、オリゴ9：ヒトADD遺伝子の

塩基多型 (G l y 4 6 0 T r p) の変異型配列と相同な配列)。オリゴ10 (配列番号10) は3' 末端から2番目に野生型 (G) のヌクレオチド配列、および3番目に人為的ミスマッチ (A→T) を有し、オリゴ11 (配列番号11) は3' 末端から2番目に変異型 (T) のヌクレオチド配列、および3番目に人為的ミスマッチ (A→C) を有し、それぞれオリゴ7と組み合わせて増幅反応のプライマーとして使用される。オリゴ12 (配列番号12) とオリゴ13 (配列番号13) はそれぞれオリゴ10とオリゴ7およびオリゴ11とオリゴ7の増幅産物を検出するためのセンス鎖のプロープとして使用される。なお、オリゴ7、10、11は必要により標識して使用される。また、オリゴ8、9、12および13は5' 末端には特表昭60-500717号公報に開示された合成法により5位にリンカーアームを有するウリジンが導入されている。

(2) P C R法およびハイブリダイゼーション法によるADD遺伝子多型の解析

①P C R法による増幅反応

ヒト白血球からフェノール・クロロホルム法により抽出した3種類のDNA溶液 (野生型のホモ (Gホモ、G/G)、変異型のホモ (Tホモ、T/T)、ヘテロ型 (G/T)) をサンプルとして使用して、下記試薬を添加して、下記条件によりヒトADD遺伝子多型を解析した。

(a) 試薬及び増幅条件

以下の試薬を含む25 μ l 溶液を調製した。

KOD DNAポリメラーゼ反応液

オリゴ6、10および/または11のいずれか	5 p m o l
オリゴ7 (5' をビオチンにより標識)	5 p m o l
×10緩衝液	2. 5 μ l
2 m M d N T P	2. 5 μ l
2 5 m M M g S O ₄	1. 2 μ l
KOD-p l u s DNAポリメラーゼ	0. 2 U
抽出DNA溶液	1 0 0 n g

増幅条件

94℃・5分

94℃・15秒、60℃・30秒、68℃・30秒（35サイクル）

68℃・2分

(b) ハイブリダイゼーション法による検出

オリゴ8、9、12、13を各々50mM ホウ酸緩衝液（pH10.0）、100mM MgCl₂の溶液の2.5pmol/mlに調製し、ポリスチレン製マイクロプレート（MicroFLUOR B、ダイナテック社製）に、1ウェルあたり100μlずつ分注し、15時間程度室温に放置することで、マイクロタイタープレート内面に結合させた。その後、0.1pmol dNTP、0.5% PVP（ポリビニルピロリドン）、5×SSCに置換して、非特異反応を抑えるためのブロッキングを室温で2時間程度行った。最後に1×SSCで洗浄して乾燥させた。

(a) の各増幅反応液を10倍に希釈し、0.3N NaOHで増幅反応液中の増幅されたDNAを変性させ、各サンプルごとに増幅反応液20μlを200mM クエン酸-リン酸緩衝液（pH6.0）、2% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、750mM NaCl、0.1% NaN₃の溶液100μlに加えて、上記の検出用捕捉プローブが結合したマイクロタイタープレートに投入した。蒸発を防ぐため流動パラフィンを重層し、55℃で30分間振盪させた。これによって、増幅されたADD遺伝子断片が固定化されたプローブによって特異的にマイクロタイタープレートに捕捉される。

次に、2×SSC（pH7.0）、1% SDSに置換し同様に蒸発を防ぐため、流動パラフィンを重層し、55℃で20分間振盪させた。その後、アルカリフォスファターゼを標識したストレプトアビジン（DAKO製：DO396）を50mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）、1% BSAの溶液で2000倍に希釈した溶液100μlと置換し、37℃で15分間振盪させた。これによって、捕捉されたDNAのビオチンにアルカリ性ホスファターゼ標識したストレプトアビジンが特異的に結合した。250μlの50mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.5）、0.025% Tween 20溶液で3回洗浄後、アルカリ性

WO01/042498

ホスファターゼの発光基質であるジオキセタン化合物（商品名：Lumipho

s 480 ; Lumigen 社) 50 μ l を注入し、37℃で15分間保温後に暗室中でホトンカウンター (浜松ホトニクス社) で発光量を測定した (単位 k i l o c o u n t / s e c o n d , k c p s) 。

これらの工程はすべて、DNAプローブ自動測定システム (日本臨床検査自動化学会会誌 第20巻、第728頁 (1995年) を参照) により自動で行われ、所要時間は約2.5時間であった。

表3

フォワード プライマー	リバース プライマー	サンプル	野生型検出用 プローブ	変異型検出用 プローブ	比
			オリゴ8 (野生型 (G) 用)	オリゴ9 (変異型 (T) 用)	
オリゴ6 (共通)	オリゴ7 (共通)	G / G	16.25	0.85	19.12
		G / T	7.45	7.07	1.05
		T / T	0.39	5.03	0.08
			オリゴ12 (G用)	オリゴ13 (T用)	
オリゴ10 (野生型 (G) 用)	オリゴ7 (共通)	G / G	18.11	0.05	362.20
		G / T	15.33	0.11	139.36
		T / T	0.13	0.20	-
オリゴ11 (変異型 (T) 用)	オリゴ7 (共通)	G / G	0.30	0.07	-
		G / T	0.36	12.78	0.03
		T / T	0.11	26.02	0.00
オリゴ10 及び オリゴ11	オリゴ7 (共通)	G / G	46.27	0.31	149.26
		G / T	11.99	6.28	1.92
		T / T	0.36	15.48	0.02

(kcps)

G/G: 野生型ホモ

G/T: ヘテロ型

T/T: 変異型ホモ

上記のように、プライマーの3'末端から2番目の塩基に多型塩基、および3番目に人為的な変異を含むプライマー2種を単独または混合して増幅し、それぞれの増幅産物に特異的で、相互に2塩基の相違のある2種の検出用オリゴを使用することで遺伝子型を明確に判定することができた。

産業上の利用の可能性

上述したように、本発明により、標的核酸中の塩基多型を明確にまた簡便に検出できる方法が提供される。本発明の方法では、偽陽性が生じないので、遺伝子

増幅法の条件をそれほど厳密にしなくても再現性良く結果が得られ、機種の違い等によって判定結果が異なることはなくなった。また、本発明の方法によれば、従来法では困難であったホモ接合とヘテロ接合の識別も可能になった。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA

<120> A METHOD FOR DETECTING SNPs

<130> P00-48

<140>

<141>

<150> JP P1999-351837

<151> 1999-12-10

<150> JP P2000-208794

<151> 2000-07-10

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

gacgaatgig atggccaca

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gacgaatgig atggccacg

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

gacgaatgig atggccacal

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gacgaatgtg atggccacgt

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

tigatgagt1 ccacgtat11 cg

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

agacaagaatg gctgaactct gg

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

cacaccttag tcttcgactt gg

22

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 8

gaagggcaga atggaagca

19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 9

gaatggcaga atggaagca

19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

gacgaagcctt ccgaggatgg

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

gacgaagctt ccgaggactg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 12

cgaggatggg cagaatggaa

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe

<400> 13

cgaggactgg cagaatggaa

20

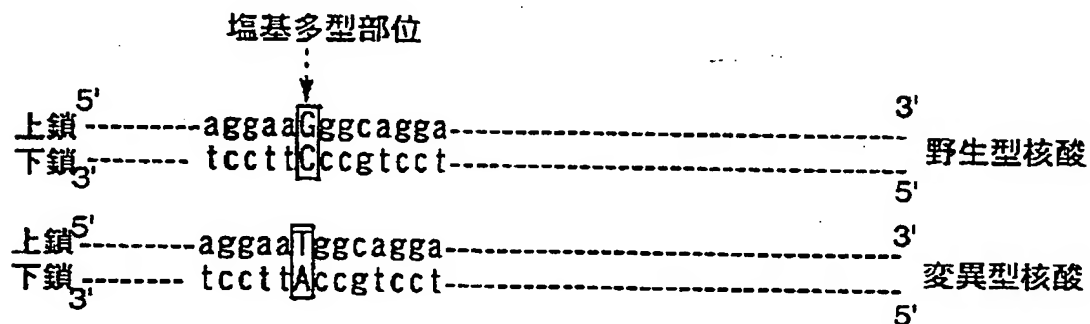
【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明の検出方法における伸長または増幅を示す図である。

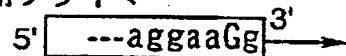
図 2 は、本発明の実施例 2 で使用したオリゴヌクレオチドの位置を示す。

【図 1】

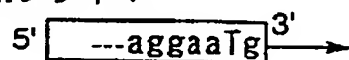
標的核酸の配列



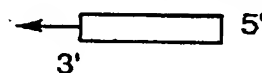
野生型用プライマー



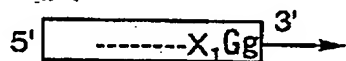
変異型用プライマー



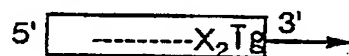
リバースプライマー



野生型用プライマー 2

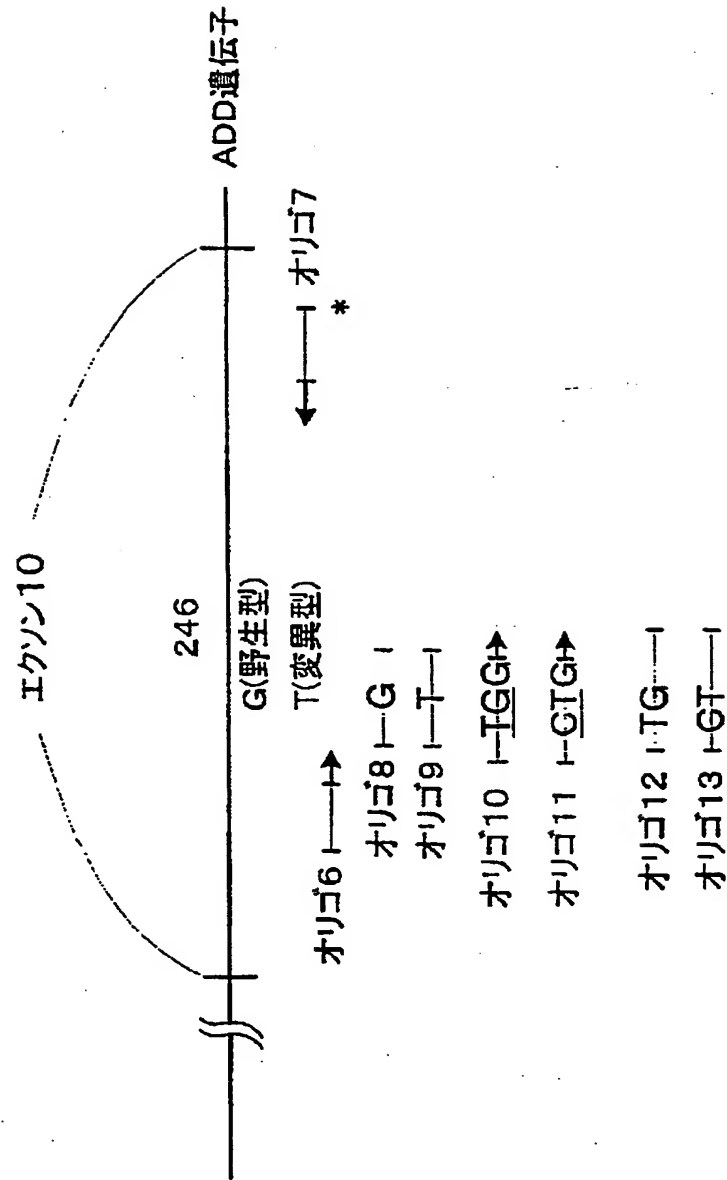


変異型用プライマー 2



$X_1, X_2 = T, G, C$ (X_1, X_2 は同一または相異なっているもよい。)

【図2】



【国際調査報告】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO0/08657	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12Q1/68, C12N15/09			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12Q1/68, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Kazunori Okano et al. "Characteristics of selective polymerase chain reaction (PCR) using two-base anchored primers and improvement of its specificity" Electrophoresis (1998) Vol.19 No.18 P.3071-3078	1-35	
A	Krzysztof Lewandowski et al. "AN ALTERNATIVE METHOD FOR IDENTIFYING THE FACTOR V GENE LEIDEN MUTATION" Thrombosis Research (1997) Vol.85 No.2 P.105-113	1-35	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 13.03.01		国際調査報告の発送日 21.03.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/08657

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	Maria Sasvari-Szekely et al. "Rapid genotyping of factor V Leiden mutation using single-tube bidirectional allele-specific amplification and automated ultrathin-layer agarose gel electrophoresis" Electrophoresis (March 2000) Vol. 21 No. 4 P. 816-821	1-35

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

フロントページの続き

(72)発明者 吉賀 聡子
滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社 総合研究所内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。